NAOSITE: Nagasaki University's Academic Output SITE

Title	魚類を用いた内分泌かく乱化学物質評価法に関する研究
Author(s)	石橋, 弘志
Citation	(2003-03-31)
Issue Date	2003-03-31
URL	http://hdl.handle.net/10069/7316
Right	

This document is downloaded at: 2015-11-06T04:42:38Z

http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp

第３章　市販魚類用飼料による雄キンギョ血中ビテロゲニン合成と植物エストロゲン含量

３．１　研究目的

近年、環境中に放出あるいは存在している内分泌かく乱化学物質が、野生生物やヒトの生体内に取り込まれホルモン疑似作用やホルモン撹乱作用を引き起こすことが危惧されている[1,2]。世界各地で確認されている野生の魚類における生殖異常は、主に水環境中に存在するエストロゲン様物質などの化学物質によって引き起こされていると考えられている[3,4]。約 70 種類以上の天然エストロゲン、合成エストロゲン及び芳香族有機塩素系化合物といった化学物質が内分泌かく乱化学物質として疑われており、これらの多くはエストロゲン様作用を有している。これらのことから、早急に *in vitro* 及び *in vivo* 試験系において内分泌かく乱化学物質のエストロゲン活性をスクリーニングし評価する必要がある。

国際経済協力機構（OECD）やアメリカ環境保護庁（USEPA）によって、世界標準となる魚類を用いた内分泌かく乱化学物質のスクリーニング試験法が開発、確立されつつある。これら試験系において、例えばファットヘッドミノー *Pimephales promelas*、ゼブラフィッシュ *Danio rerio*、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* 及びメダカ *Oryzias latipes* など、最も内分泌かく乱化学物質に対して感受性の高い系統魚の使用や、飼育及び試験期間中の飼料の種類及び水温、またそれら以外の標準的飼育条件の確立も要求されている。ところが、最近の報告において、飼育用の飼料中に含まれる植物エストロゲンが生体内でエストロゲン様作

用を示し生殖機能に影響を及ぼすことが示唆されている[5,6]。これら植物エストロゲンは組織に局在するエストロゲン受容体に結合し、RNA 転写を促進しアゴニスト作用を示す[7,8]。また、RNA 転写を抑制しアンタゴニスト作用を示すことも示唆されている[9]。これらの事実は、内分泌かく乱化学物質のスクリーニング試験において、飼料中に含まれる植物エストロゲンが試験化学物質のアゴニストもしくはアンタゴニスト作用を検出不可能にする可能性を示唆するものである。

キンギョ *Carassius auratus* は、コイ科の硬骨魚類で生殖内分泌の研究に広く利用されている。成熟したキンギョは小型で扱いやすく、内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様作用を評価するのに最適な試験魚であると考えられる。また近年、魚類のエストラジオール-17β（E2）や 11-ケトテストステロンなどステロイドホルモンの解析に加え、卵黄前駆タンパクビテロゲニンは、多くの魚類及び他の卵生脊椎動物において、エストロゲン様物質曝露の指標として有用であると考えられている。硬骨魚類においてビテロゲニンは卵濾胞細胞により分泌される E2 により肝臓中で合成され、血中を介して卵へ取り込まれ、卵黄タンパクに開裂する。またエストロゲン処理をすると未熟並びに雄魚にも検出されることから、合成エストロゲン、アルキルフェノール類及び農薬など多くの化学物質のエストロゲン活性評価に有用であると考えられている[10]。第２章において、キンギョ血中ビテロゲニンの測定系を確立し、合成化学物質ビスフェノール A のエストロゲン様作用を明らかにした[11]。

本研究では、市販の魚類飼料中に含まれる植物エストロゲン含量を明らかにするため、2 種類の魚類用飼料中（マス用飼料；TD、コイ用飼料；CD）のゲ

ニステイン、ダイゼイン、クメストロール及びイクオール含量を液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）で測定し、大豆及び魚粉不使用のカゼインを主原料とした開発飼料 No.2（FD）中のそれら含量と比較した。また、カゼインまたは大豆を主原料とした市販の乳児用粉ミルクについても比較、検討を行った。さらに、これら 3 種類の魚類用飼料が卵巣摘出キンギョ及び雄キンギョ血中ビテロゲニン産生に及ぼす影響を検討し、それらの *in vivo* 試験系におけるエストロゲン様作用を評価した。

３．２　実験方法

３．２．１　魚類用飼料と粉ミルク

３種類の魚類用飼料、マス用（TD）及びコイ用（CD）の市販魚類用飼料と、今回開発した大豆あるいは魚粉不使用のカゼイン主原料の No.2 飼料（FD）を用いた。各種飼料の原料と成分を Table 1 に示す。FD はカゼイン、小麦粉、ビタミンミックス及びミネラルミックスを混合し、水を加え機械を用いてペレット状にし、2-3 時間 95℃で乾燥させた。ペレットは細かく砕き、小型魚類が摂食可能なサイズにふるいを用い作製した。また、市販の大豆及びカゼインを主原料とした乳児用粉ミルクも用いた。これら乳児用粉ミルクは取扱説明書に従って精製水に溶解し濃度調製した。

３．２．２　魚類用飼料がキンギョの血中ビテロゲニン合成に及ぼす影響

３．２．２．１　供試魚

二次性徴を示す成熟した雌雄キンギョを養殖業者から購入した。これらは自然状態下の温度と光周期で研究室内の水槽で維持した。

３．２．２．２　異なる飼料による飼育試験

21 個体の雄キンギョ（標準体重；6.4-13.4 g）を 3 群に分け、それぞれ 25 l 容のガラス製水槽で飼育温度 23-26℃、光周期 12 時間明期、12 時間暗期で維持した。TD、CD 及び FD はそれぞれ体重の 1.0 %量を 48 時間毎に 31 日間与えた。飼育水は 72 時間毎に全量を脱塩素水道水と交換した。

卵巣摘出キンギョの作製は Kobayashi と Stacey らの方法[12]に従い行った。雌キンギョを 0.02 % MS-222 で麻酔後、腹部（正中線）を切開し卵巣を摘出した。

摘出後、手術用絹糸で縫合し、0.5 %塩化ナトリウム、50 mg/l オキシテトラサイクリン含有の脱塩水道水中で 2 日間飼育した（水温 20℃）。2 日後、通常の飼育水で 7～10 日間飼育後、麻酔して抜糸を行った。また卵巣摘出を行っていない偽手術魚も同様にして作製した。作製した卵巣摘出魚には FD、TD 及び CD を、偽手術魚には FD を、無処理雌キンギョには FD 及び CD をそれぞれ体重の 1.0 %量を 48 時間毎に 31 日間与えた（標準体重；13.3-30.5 g）。また、エストラジオール-17β（E2）初期設定濃度 100 μg/l に曝露し FD を与えた群を陽性対照とした。その他の条件は全て雄魚と同様に行った。

Table 1. Ingredient and composition of the three diets

Fish diets	Ingredients
FD	casein 80 %, wheat flour 18 %, vitamin mix 0.5 %, mineral mix 1.5 %
TD	fish meal 60 %*, wheat flour 29 %, soya bean 4 %, rice bran 2 %, yeast and vegetable oil 5 %, vitamin mix, mineral mix
CD	wheat flour**, soya bean meal, fish meal, alfalfa meal, rice bran, shrinp meal, spirulina, vitamin mix, mineral mix, methionin

* Composition which does not include vitamin mix and mineral mix.

** Composition of the ingredients is not shown.

３．２．３　試料採取

血液は魚の尾部動静脈より 25 G の注射針を用いて採取した。血液は直ちに 0.1 容量の aprotinin（10,000 KIU/ml）、0.1% PMSF 及びヘパリン（14.0 U/ml）を含む生理食塩水溶液と混合した。混合液は 4℃で 20 分間（1,800×g）遠心して血漿を分離した。血漿は、1.5ml チューブに分注し、速やかに凍結し使用するまで –30℃で保存した。全ての操作は 4℃で行った。31 日間の飼育後、標準体重及び標準体長を測定した。測定後、解剖を行い生殖腺及び肝膵臓を摘出し、重量を測定した。それぞれの重量から生殖腺体指数 GSI（生殖腺重量×100/標準体重）及び肝臓体指数 HSI（肝膵臓重量×100/標準体重）をそれぞれ算出した。

３．２．４　血中ビテロゲニン測定

キンギョビテロゲニンは E2 処理した雄血漿から陰イオン交換カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により精製した [13]。精製ビテロゲニンのタンパク量は Bradford 法 [14]により牛血清アルブミンを標準物質として定量した。血中ビテロゲニン濃度は第２章の方法に従って酵素免疫測定法（ELISA）により測定した。精製キンギョビテロゲニンを標準物質とし、希釈した血中におけるビテロゲニン濃度を定量した。本 ELISA 系は全て室温下で行い、キンギョなどコイ科硬骨魚類のビテロゲニンに交差反応性を示すコイリポビテリンに対するマウスモノクローナル抗体（トランスジェニック：熊本）を 1 次抗体として用いた。2 次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識した抗コイビテロゲニンウサギポリクローナル抗体（トランスジェニック）を、基質として o-フェニレンジアミン（和光純薬：東京）を用いた。血中ビテロゲニン濃度は、

精製ビテロゲニン標準物質の検量線から算出した。本 ELISA 系におけるビテロゲニンの検出限界は 39 ng/ml であった。

３．２．５　魚類飼料及び粉ミルク中の植物エストロゲン測定

３．２．５．１　化学物質

ゲニステイン、ダイゼイン、クメステロール及びイクオールはフナコシ（東京）から、ヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸、及び酢酸ナトリウムは和光純薬（東京）から購入した。β-グルクロニダーゼ及びスルファターゼはバイオテスト研究所（東京）から購入した。メタノール及びアセトニトリルは関東化学（東京）から購入した。その他全ての試薬は、HPLC 及び分析用を用いた。

３．２．５．２　魚類飼料からの植物エストロゲン抽出と加水分解

粉砕した 5 g の飼料に 40 ml のメタノール：1M 酢酸緩衝液（9：1）を加え 50 ml 遠心管中でホモジナイズし、10 分間振とう抽出後、超音波処理した（10 分間）。抽出後、遠心分離（2,000 rpm、10 分間、室温）し、上層を 200 ml 容メスフラスコに取り、下層に上記バッファーを入れ再度抽出を行い、さらに同様の操作を繰り返し、メタノールで 200 ml に定容した。抽出試料 1 ml を窒素ガス気流下で乾固し、精製水 200 μl で溶解後、β-グルクロニダーゼ及びスルファターゼをそれぞれ 2,100 U/ml 及び 1,050 U/ml 含む 0.5M 酢酸緩衝液（pH 4.5）を加え、17 時間酵素反応を行った（37℃）。酵素反応後、5 ml のジエチルエーテルで 2 回抽出を行い遠心分離し、抽出試料は窒素ガス気流下で乾固した。得られた試料は 200 μl のメタノール：アセトニトリル：精製水（2：1：3）に溶解

し、1 分間超音波処理後、Ultrafree-MC (0.22 μm、ミリポア、東京)で遠心分離した（10,000 rpm、1 分間、室温)。試料 5 μl を LC-MS/MS 測定に供した。

３．２．５．３　乳児用粉ミルクからの植物エストロゲン抽出と加水分解

取扱説明書に従い、粉ミルク 10 g に 50 ml の精製水を加え溶解した（50℃)。この試料 0.5 ml にβ-グルクロニダーゼ及びスルファターゼをそれぞれ 2,100 U/ml 及び 1,050 U/ml 含む 0.5M 酢酸緩衝液（pH 4.5）を加え、1 時間酵素反応を行った（37℃)。酵素反応後、5 ml のジエチルエーテルで 2 回抽出を行い遠心分離し、抽出試料は窒素ガス気流下で乾固した。得られた試料は 250 μl のアセトニトリルに溶解し、250 μl の精製水と 1 ml のヘキサンを加えた。混合後ヘキサン層を完全に除去した。Ultrafree-MC (0.22 μm、ミリポア、東京)で遠心分離後（3,000 rpm、10 分間、室温)、試料 5 μl を LC-MS/MS 測定に供した。

３．２．５．４　LC-MS/MS 分析条件

試料の分離及び検出は、HP 1100 Series（ヒューレットパッカード、東京）及び Quattro-UltimaTM （マイクロマス、東京）の LC-MS/MS を用いた。LC 測定には ODS column (4.6×250 mm, センシュー化学、東京)を用い、カラムオーブンは 40°C に設定した。流速は 1.0 ml/min でリニアグラジェント法により行った。以下に使用溶媒及び測定条件を示す。

Buffer A, acetic acid to purified water (1:999, by vol)

Buffer B, methanol-acetonitrile (2:1, by vol)

B in A (by vol) at 30 % for 1 min, from 30 % to 100 % in 20 min from 100 % to 100 %

in 25 min from 100 % to 30 % in 26 min, and from 30 % to 30 % in 35 min.

MS は multiple reaction monitoring mode で、collision energy は 30 eV (イクオールのみ 15 eV)、cone voltage は 80 V で行い、ゲニステインの masses-to-charge ratio(*m/z*)は 269, 133、ダイゼインは 253, 208、イクオールは 241, 121、クメステロールは 267, 266 を標準として測定した。

３．２．６　統計解析

全ての統計処理は、Stat View 5.0 for Macintosh を用いて行い、$p<0.05$ を有意差とみなした。標準体長、標準体重、GSI、HSI 及び血中ビテロゲニン濃度は等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合は一元配置分散分析（one way ANOVA）を行った。一元配置分散分析において、有意差が認められた場合には多重検定（Scheffe's F post-hoc 検定）により有意差を検定した。等分散性が認められない場合は Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、有意差が認められた場合には Bonferroni adjusement をもって Mann Whitney の U 検定を行った。また血中ビテロゲニン濃度において、定量下限値以下のデータに関しては定量下限の半数値を用いた。

３．３　結果

３．３．１　魚類飼料中の植物エストロゲン含量

魚類飼料中における FD、TD 及び CD の植物エストロゲン含量を Table 2 に示す。CD 中のゲニステイン（390,800 ng/g）は、FD（93.2 ng/g）や TD（47,680 ng/g）と比較して高含量であった。CD 中のダイゼイン（416,800 ng/g）もまた、FD（129.6 ng/g）や TD（41,120 ng/g）と比較して高含量であった。CD 中のクメストロールは 1,324.8 ng/g 検出され、FD（8.8 ng/g）や TD（226.4 ng/g）と比較して高含量であった。CD（6.4 ng/g）及び TD（117.2 ng/g）においてイクオールが検出されたが、最も高いイクオール含量を示したものは FD（1027.2 ng/g）であった。

３．３．２　乳児用粉ミルク中の植物エストロゲン含量

乳児用粉ミルク中の植物エストロゲン含量を Table 2 に示す。Milk A、milk C のゲニステイン含量は、それぞれ 475 ng/ml、148 ng/ml 検出され、milk B では検出限界以下であった。しかし、大豆を主原料とした soya bean milk は最も高いゲニステイン含量（211,600 ng/ml）を示した。Milk A、milk C のダイゼイン含量は、それぞれ 194.5 ng/ml、47.5 ng/ml 検出され、milk B では検出限界以下であった。大豆を主原料とした soya bean milk は、最も高いダイゼイン含量（91,200 ng/ml）を示した。Milk A、B 及び C のイクオール含量は、それぞれ 14 ng/ml、13.5 ng/ml 及び 7 ng/ml 検出され、大豆を主原料とした soya bean milk は 5.5 ng/ml 検出された。Milk A、B 及び C 中のクメステロールは検出限界以下であったのに対し、大豆を主原料とした soya bean milk では 2.5 ng/ml 検出された。

Table 2. Concentrations of phytoestrogens in fish diets and commercial powdered infant milks using LS-MS/MS analysis.

Diet	Genistein	Daidzein	Equol	Coumestrol
FD	93.2	129.6	1,027.2	8.8
TD	47,680.0	41,120.0	117.2	226.4
CD	390,800.0	416,800.0	6.4	1,324.8
Milk A	475.0	194.5	14.0	N.D.
Milk B	N.D.	N.D.	13.5	N.D.
Milk C	148.0	47.5	7.0	N.D.
Soya bean milk	211,600.0	91,200.0	5.5	2.5

The data of fish diets and commercial infant powdered milks were represent total ng/g diet and total ng/ml milk, respectively. N.D.: Not Detected. Data represents the mean (n=3).

３．３．３　雄魚の標準体重、標準体長、GSI、HSI 及び血中ビテロゲニン濃度

給餌前の標準体長は、FD 給餌群は 6.66±0.50 cm、TD 給餌群は 6.98±0.43 cm、CD 給餌群は 7.22±0.46 cm であった。給餌 31 日後の標準体重は、FD 給餌群は 6.56±0.43 cm、TD 給餌群は 6.50±0.34 cm、CD 給餌群は 6.73±0.47 cm であった（Fig. 1-A)。これら 3 群間における給餌前及び後の標準体長において有意差は認められなかった（ANOVA)。給餌前の標準体重は、FD 給餌群は 9.1±1.9 g、TD 給餌群は 10.2±1.6 g、CD 給餌群は 11.4±1.7 g であった。給餌 31 日後の標準体重は、FD 給餌群は 9.0±1.9 g、TD 給餌群は 8.9±1.5 g、CD 給餌群は 10.2±1.5 g であった（Fig. 1-B)。これら 3 群間における給餌前及び後の標準体重において有意差は認められなかった（ANOVA)。

各種飼料の給餌 31 日後における各群の GSI と HSI を Fig. 1 に示す。各群の GSI は平均 0.3~0.4 %程度（Fig. 2-A）で、HSI は平均 2~3 %程度（Fig. 2-B）であった。これら各群間の GSI 及び HSI において有意差は認められなかった（ANOVA)。

各種飼料の給餌 31 日後における各群の血中ビテロゲニン濃度を Fig. 3 に示す。CD 給餌群の血中ビテロゲニン濃度は 78.01±48.18 μg/ml 検出され、TD 給餌群（3.51±3.83 μg/ml）と比較して統計学的に有意に増加した（p<0.01, Scheffe's F post-hoc 検定)。また、FD 給餌群の血中ビテロゲニン濃度は検出限界以下（39 ng/ml）であった。

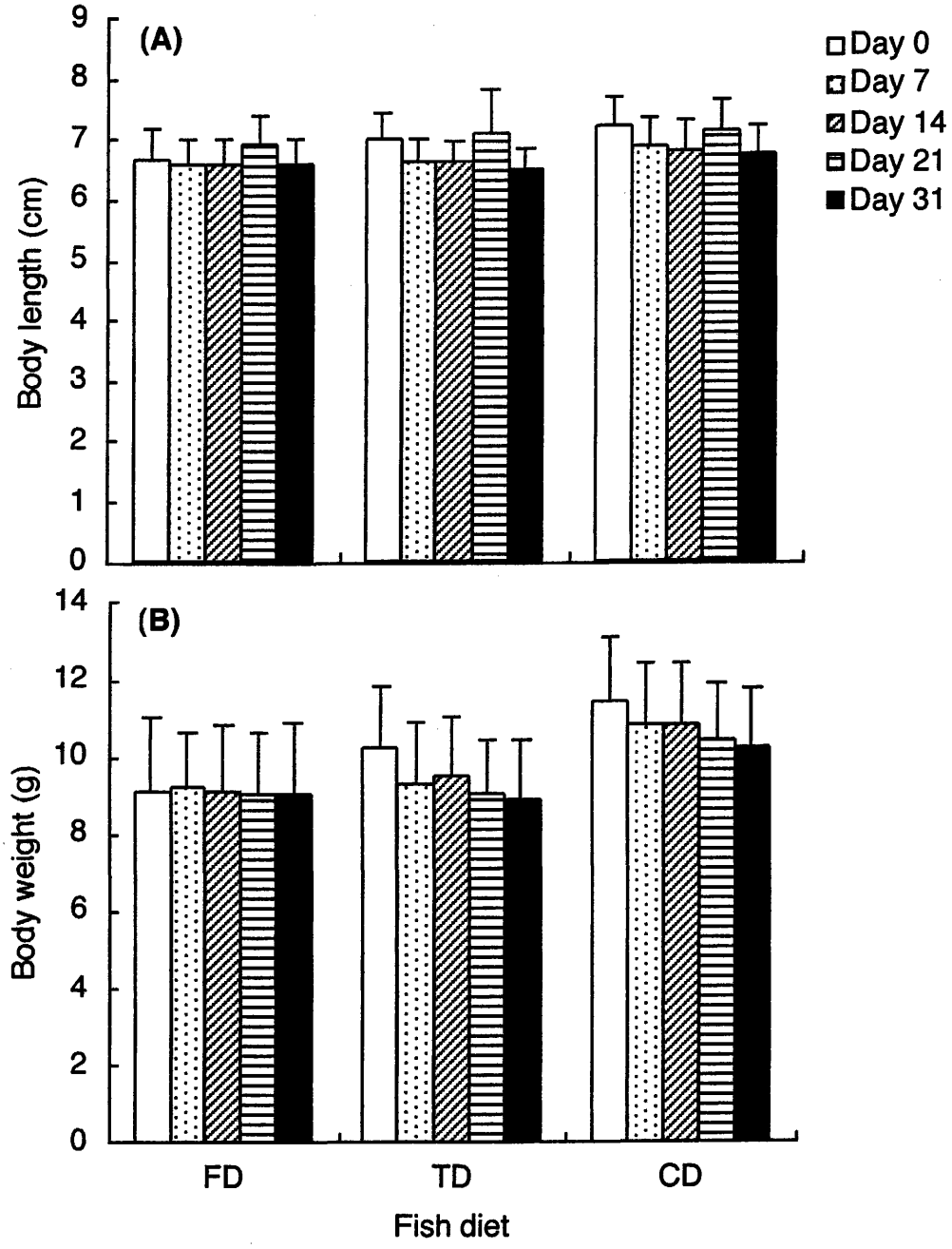

Fig. 1. Change in body length (A) and body weight (B) in the male goldfish fed FD, TD, or CD for 31 days. Fish were fed 1.0 % body weight volume of one of the three diets (TD, CD and FD) every two days for 31 days. Columns and bars represent the mean and standard deviation.

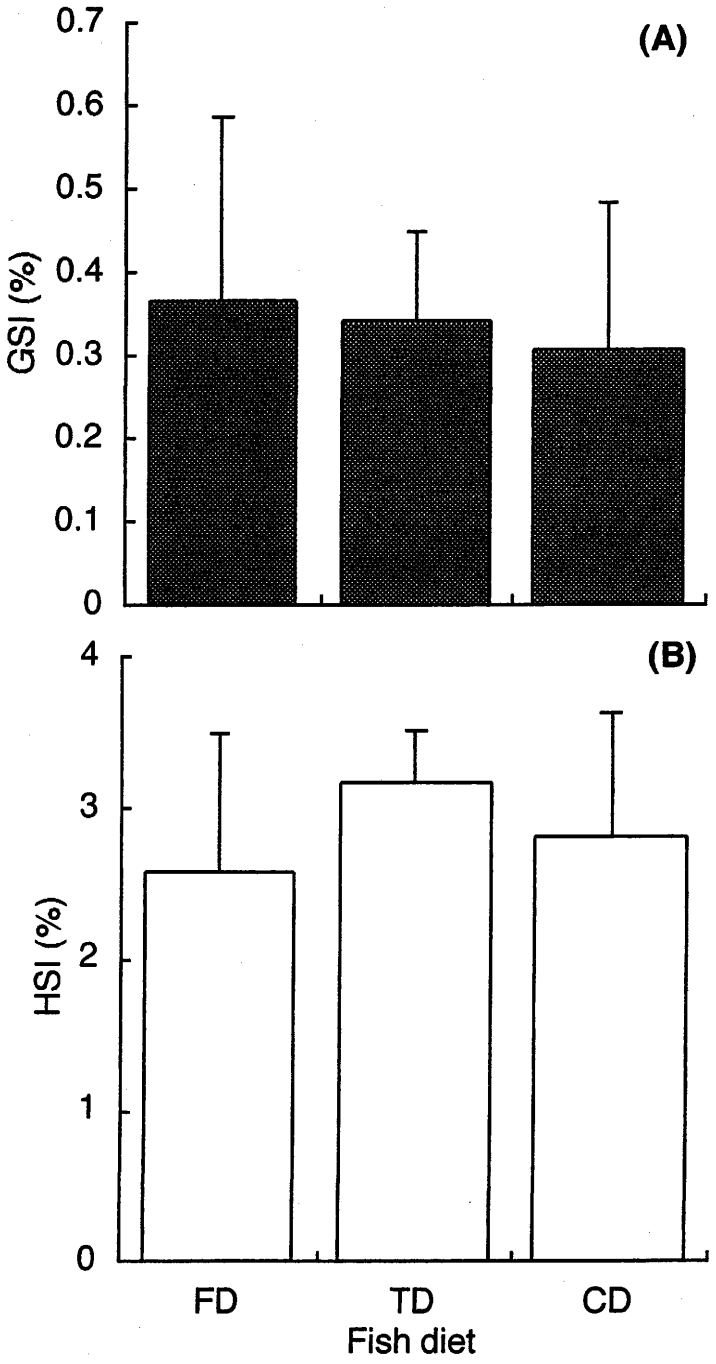

Fig. 2. GSI (A) and HSI (B) in adult male goldfish. Fish were fed 1.0 % body weight volume of one of the three diets (TD, CD and FD) every two days for 31 days. Columns and bars represent the mean and standard deviation.

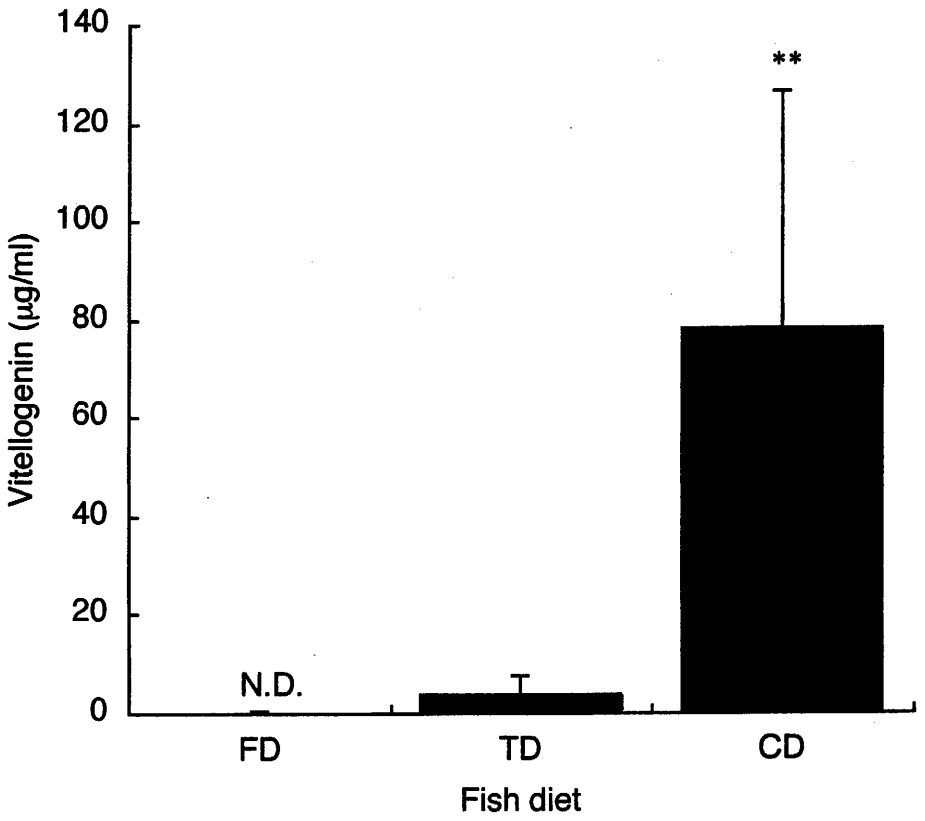

Fig. 3. Plasma vitellogenin levels in adult male goldfish. Fish were fed 1.0 % body weight volume of one of the three diets (TD, CD and FD) every two days for 31 days. N.D. = Not Detected (less than 39 ng/ml). Columns and bars represent the mean and standard deviation. **, Significant difference compared to TD-fed fish ($p<0.01$, ANOVA and Scheffe's F Post-hoc test).

３．３．４　卵巣摘出魚の標準体重、標準体長、GSI、HSI 及び血中ビテロゲニン濃度

卵巣摘出魚の給餌前における標準体長は、FD 給餌群は 9.2±0.9 cm、TD 給餌群は 8.5±0.9 cm、CD 給餌群は 8.6±0.6 cm であった。給餌 31 日後の標準体重は、FD 給餌群は 9.1±0.9 cm、TD 給餌群は 8.5±0.8 cm、CD 給餌群は 8.7±0.7 cm であった（Fig. 4-A)。これら 3 群間における給餌前及び後の標準体長において有意差は認められなかった（ANOVA)。一方、給餌前における標準体重は、FD 給餌群は 24.1±5.5 g、TD 給餌群は 20.6±5.6 g、CD 給餌群は 19.9±4.7 g であった。給餌 31 日後の標準体重は、FD 給餌群は 24.6±7.2 g、TD 給餌群は 20.9±5.4 g、CD 給餌群は 20.4±4.7 g であった（Fig. 4-B)。これら 3 群間における給餌前及び後の標準体重において有意差は認められなかった（ANOVA)。また、偽手術魚及び無処理雌魚の標準体長と標準体重は、卵巣摘出魚のそれらと有意差は認められなかった（ANOVA)。

各種飼料の給餌 31 日後における各群の GSI と HSI を Fig. 4 に示す。卵巣摘出魚各群の GSI は平均 0.02～0.14 %程度（Fig. 5-A）で、各群間の有意差は認められなかった（ANOVA)。また、偽手術魚及び無処理雌魚の GSI は平均 1.57～1.99 %であった。一方、全ての群の HSI は平均 1.8～2.2 %程度（Fig. 5-B）であった。これら各群間の HSI において有意差は認められなかった（ANOVA)。

各種飼料の給餌 31 日後における各群の血中ビテロゲニン濃度を Fig. 6 に示す。卵巣摘出魚において、CD 給餌群の血中ビテロゲニン濃度は、FD 及び TD 給餌群と比較して若干高い値を示す傾向にあったが、統計学的な有意差は認められなかった（Kruskal-Wallis 検定)。また、陽性対照として設定した E2-100 μg/l

を曝露しFDを与えた群の血中ビテロゲニン濃度は、FD, TD及びCD給餌群と比較して有意に増加した（$p<0.05$, Mann-Whitney's U 検定）。一方、FD を与えた偽手術魚と、FD あるいは CD を与えた無処理雌魚の血中ビテロゲニン濃度は、卵巣摘出魚群とほとんど同程度のレベルであった。また、CD を与えた無処理雌魚は若干高い血中ビテロゲニン濃度を示す傾向にあったが、他群と比較して統計学的な有意差は認められなかった（Kruskal-Wallis 検定）。

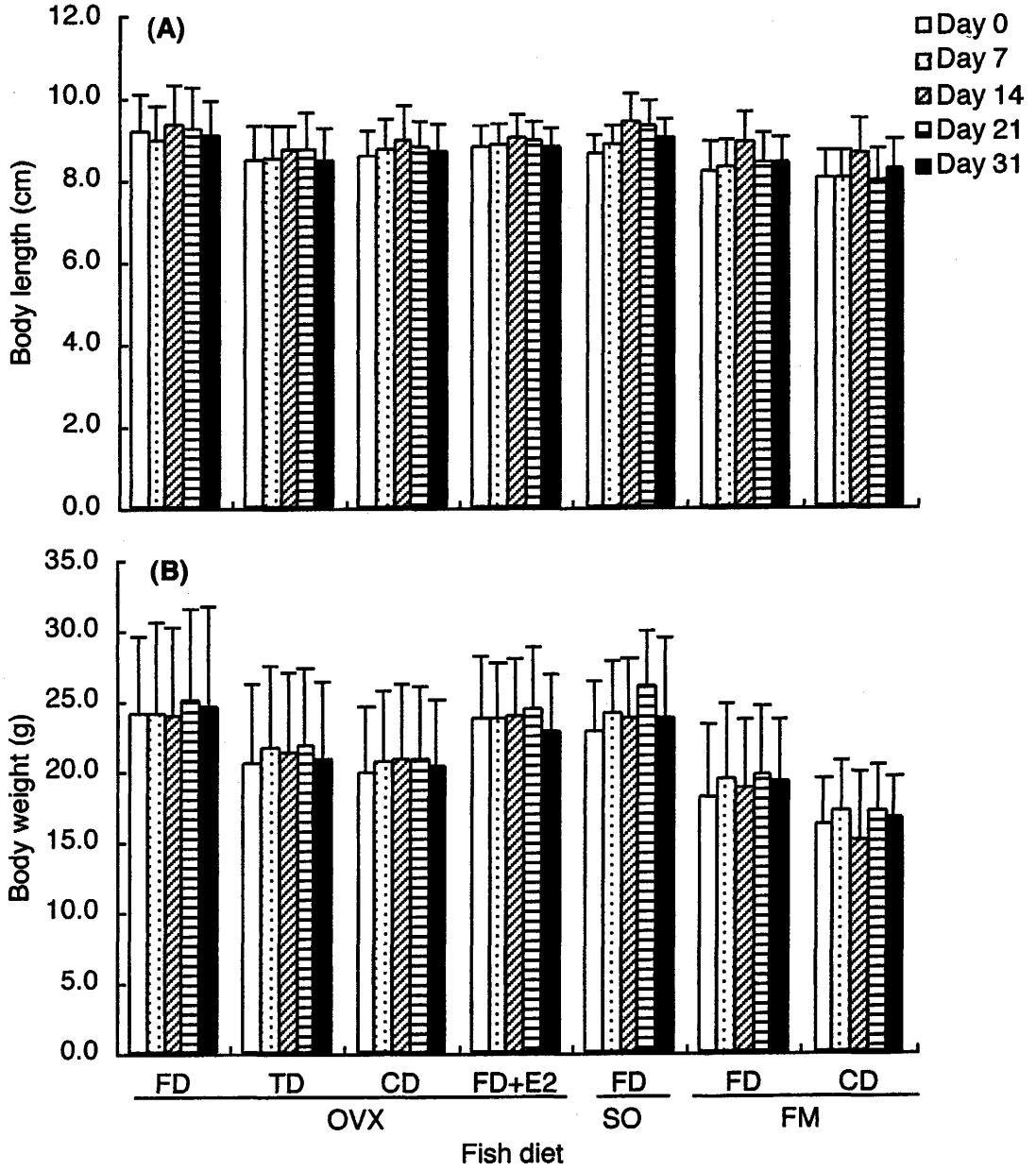

Fig. 4. Change in body length (A) and body weight (B) in the ovariectomized (OVX), sham-operated (SO), and normal female (FM) goldfish fed FD, TD, or CD for 31 days. Fish were fed 1.0 % body weight volume of one of the three diets (TD, CD and FD) every two days for 31 days. Ovariectomized goldfish fed with the FD were also exposed to nominal concentration of 100 μg/l estradiol-17β for 31 days. Columns and bars represent the mean and standard deviation.

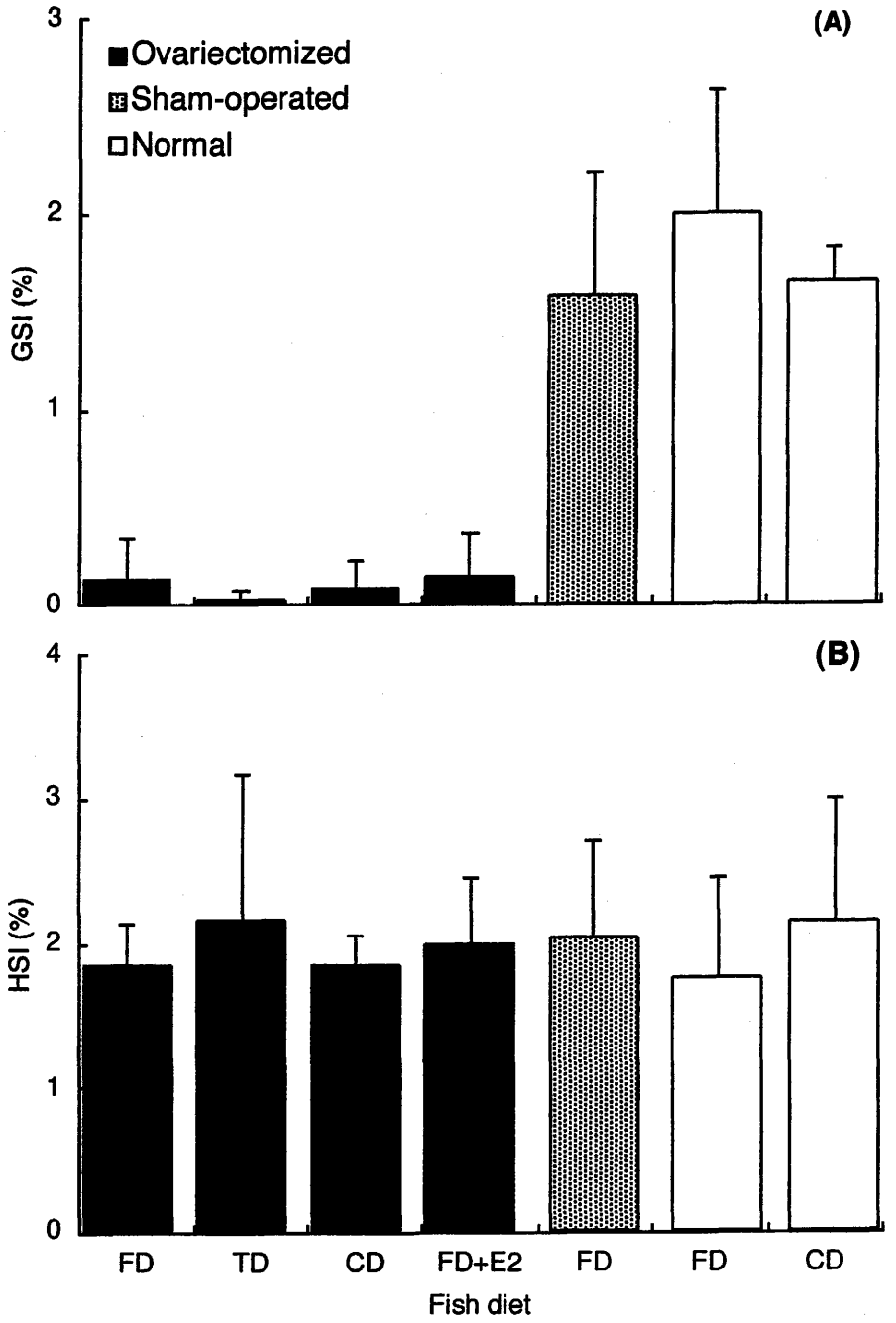

Fig. 5. GSI (A) and HSI (B) in adult ovariectomized, sham-operated, and normal female goldfish, which were fed to three diets for 31 days. Fish were fed 1.0 % body weight volume of one of the three diets (TD, CD and FD) every two days for 31 days. Ovariectomized goldfish fed with the FD were also exposed to nominal concentration of 100 μg/l estradiol-17β for 31 days. Columns and bars represent the mean and standard deviation.

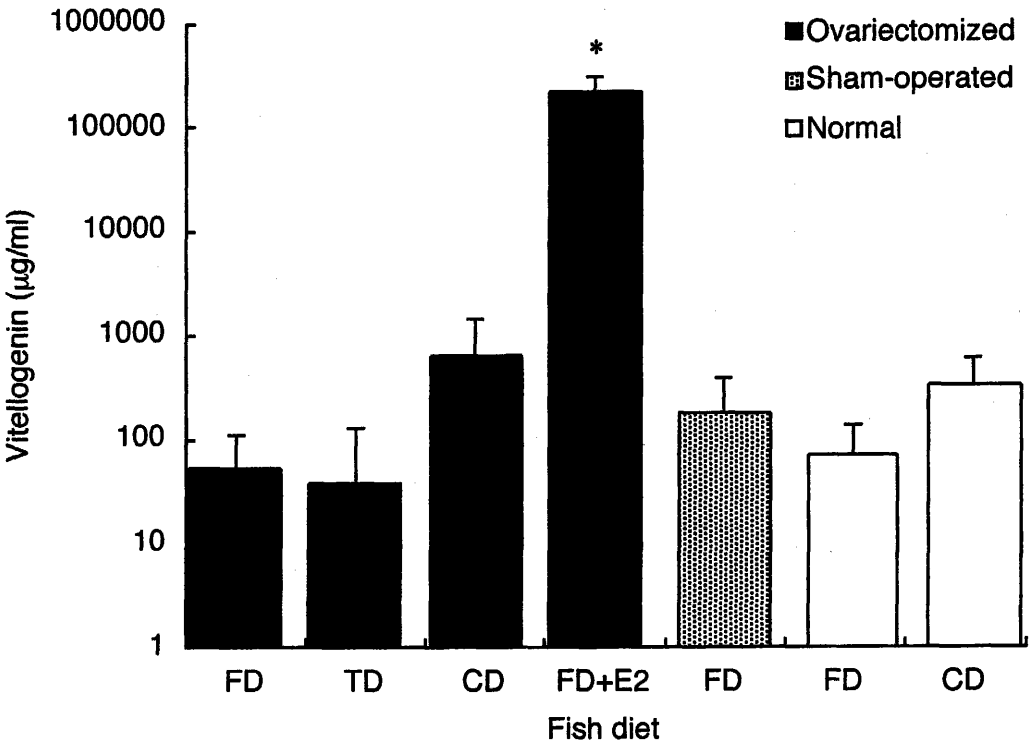

Fig. 6. Plasma vitellogenin levels in adult ovariectomized, sham-operated, and normal female goldfish, which were fed to three diets for 31 days. Fish were fed 1.0 % body weight volume of one of the three diets (TD, CD and FD) every two days for 31 days. Positive control ovariectomized goldfish fed with the FD were exposed to nominal concentration of 100 µg/l estradiol-17β for 31 days. Columns and bars represent the mean and standard deviation. *, Significant difference compared to FD-, TD-, and CD-fed ovariectomized fish ($p<0.05$, Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney's *U*-test).

3．4　考察

魚類など多くの生物において、大豆などに含まれる植物エストロゲンがエストロゲン様作用を示すことが報告されている [15,16]。本研究では、市販の魚類用飼料中の植物エストロゲン含量を明らかにするため、市販の魚類用飼料 TD 及び CD 中のゲニステイン、ダイゼイン、イクオール及びクメストロール含量を LC-MS/MS で測定し、大豆及び魚粉不使用のカゼインを主原料とした開発飼料 FD 中のそれら含量と比較した。

CD 中のゲニステイン、ダイゼイン及びクメストロール含量は、それぞれ 390,800 ng/g、416,800 ng/g 及び 1,324.8 ng/g 検出され、3 種類の飼料中で最も高かった。FD 中のそれら含量は、93.2 ng/g、129.6 ng/g 及び 8.8 ng/g 検出され、3 種類の飼料中で最も低かった。これらのことから、市販の魚類用飼料 CD 中には、植物エストロゲンが多く含まれていることが示唆された。一方、大豆を主原料とした乳児用粉ミルク（soya bean milk）中のゲニステイン及びダイゼイン含量は、4 種類の乳児用粉ミルク中で最も高く、カゼインを主原料とした乳児用粉ミルク（milk A, B 及び C）中のそれら含量は比較的低かった。一般に、多くの乳児用粉ミルクはカゼインなどを主原料として製造されており、乳児に対してアレルギーを引き起こすことが知られている。その代替品として、大豆などを主原料とした乳児用粉ミルクが使用されているが、それらに含まれる植物エストロゲンが乳児に与える影響は明らかではない。本研究において、soya bean milk 中には植物エストロゲンが多く含まれることを明らかにしたが、それらを摂取した乳児に対する影響や、他の種類の大豆を主原料とした乳児用粉ミルク中の植物エストロゲン含量も明らかにしなければならない。しかしながら、カ

ゼインを主原料とした乳児用粉ミルクは植物エストロゲン含量が低いことが示され、試作した魚類用飼料 FD も、これら乳児用ミルクと同様にカゼインを主原料とすることで植物エストロゲン含量を低くすることが示唆された。FD は製造工程等の問題により大量生産が困難であったが、今後、大量生産可能な飼料の開発及びその体制化が必要であると考えられる。

酵母 two-hybrid 法や MCF-7 細胞増殖など *in vitro* エストロゲン活性試験において、ゲニステイン、ダイゼイン、イクオール及びクメストロールは合成化学物質であるビスフェノール A やノニルフェノールと比較して強いエストロゲン活性をもつことが示唆されている[17,18]。一方、*in vivo* 試験において Pelissero ら[19]は、ゲニステイン、ダイゼイン、イクオール及びクメストロールのエストロゲン活性を未成熟シベリアチョウザメ *Acipenser baeri* の肝臓中ビテロゲニン産生を指標として評価した。それらの物質は全て肝臓中ビテロゲニン産生を誘導し、クメストロールは最も強いエストロゲン様作用を示すことを示唆した。このように海産魚を用いた *in vivo* 試験において、植物エストロゲンのビテロゲニン産生に及ぼす影響は明らかになっているが、淡水魚に関しての知見は少ない。そこで今回、植物エストロゲンを含む市販の魚類用飼料が雄キンギョの血中ビテロゲニン産生に及ぼす影響を調べ、それら飼料のエストロゲン様活性を評価した。雄キンギョに体重あたり 1 %量の FD、TD 及び CD をそれぞれ 48 時間毎に 31 日間与えた。各群の標準体長、標準体重、GSI 及び HSI に有意差は認められなかった。血中ビテロゲニン濃度は、CD 給餌群において 78.01±48.18 μg/ml 検出され、TD 給餌群の 3.51±3.83 μg/ml と比較して有意に増加した。FD 給餌群においては検出限界以下（<39 ng/ml）であった。これらの結果に加え、

TD 及び CD 中の植物エストロゲン含量は FD と比較して高かったことからも、これら飼料中に含まれる植物エストロゲンは、雄キンギョに対しエストロゲン様作用を示し血中ビテロゲニンの産生を誘導することが示唆された。さらに今回、卵巣摘出を行ったキンギョを用い、各種飼料が血中ビテロゲニン合成に及ぼす影響を検討した。卵巣摘出及び無処理雌キンギョにおいて有意差は認められなかったものの、FD あるいは TD 給餌群と比較して若干高い血中ビテロゲニンを産生し、CD 中の植物エストロゲンの影響が示唆された。しかしながら、卵巣摘出を行った FD 及び TD 給餌群において平均 50 μg/ml 前後のビテロゲニンが検出された。卵巣摘出魚は内因性ホルモンの影響をほとんど無視できるという理由からホルモンに関する研究に適用されている [12]。今回、卵巣摘出手術が不完全であった、手術前のビテロゲニンが血中に残っていた、卵巣以外の組織においてエストロゲンが少量作られた、などの理由から卵巣摘出魚の血中ビテロゲニン濃度は雄魚と比較して高いレベルを示したと考えられたが、E2 処理を行った卵巣摘出魚の血中ビテロゲニンは他の群と比較して有意に増加したことより、今後、さらなる検討を加えることによって内分泌かく乱化学物質の評価に応用できると考えられた。

これまでビテロゲニンに関する研究は、主に雌魚を対象として行われてきた。通常、ビテロゲニンは雄魚においてほとんど検出されないが、近年、エストロゲン様物質に曝露された雄魚において産生が誘導されることから、エストロゲン様物質曝露の指標になると考えられている。これら血中ビテロゲニン産生を指標としたエストロゲン様物質の評価系において、使用する飼育水槽やその他の飼育設備から試験化学物質が溶出しないことが前提となるが、エストロゲン

様物質を曝露していない雄魚において、低濃度のビテロゲニンを産生していることが報告されている[20,21]。これらは、ELISA 法など高感度な測定によって、これまで検出されなかったビテロゲニンが検出されたことが一要因としてあげられるが、植物エストロゲンなどのエストロゲン様物質を含む飼料の関与も考えられる。一般に、養殖コイなどの血中ビテロゲニン濃度は比較的高いことが知られており[22]、今回、市販のコイ用飼料 CD が雄キンギョの血中ビテロゲニンを高く誘導したことはこれらの事実を反映しているものと考えられる。また、通常、魚種に適した市販飼料が飼育に使用され、それらの原料や与える量は様々である。実験前や実験期間中のビテロゲニン産生レベルは異なることが予想され、飼料中に含まれる植物エストロゲン量や試験化学物質のエストロゲン活性強度によっては、それらがエストロゲン受容体に競合し結果として試験化学物質のエストロゲン様作用に影響を与える可能性が考えられる。これらのことから、魚類のビテロゲニン産生を指標としたエストロゲン様物質のスクリーニング試験において、市販飼料を与えた雄及び雌魚の通常の生理状態におけるビテロゲニン合成レベルを明らかにする必要がある。また今回、CD や TD など市販飼料は、雄キンギョに対しエストロゲン様作用を示し血中ビテロゲニン産生を誘導することを示したが、カゼインを主原料とした開発飼料 FD は、雄キンギョの血中ビテロゲニン濃度を低く保ち[23]試験化学物質に対する感受性を高くする可能性が示唆された。

DeKoven ら[24]は、メダカ *Oryzias latipes* を用い、精製したカゼイン主原料飼料（PC-ダイエット）の栄養価について、フレーク状魚類飼料（FL-ダイエット）、アルテミア飼料（A-ダイエット）及び FL-ダイエットと A-ダイエットを混合し

た飼料（F/A-ダイエット）の 3 種類の市販飼料と比較を行い、毒性学研究への適用性を検討した。PC-ダイエットは栄養学上問題なく、肝酵素活性を指標とした試験において生体異物を含んでいないことから、毒性学研究における標準飼料として有用であると報告した。今回、雄キンギョの血中ビテロゲニン産生を指標にして、市販及び試作飼料のエストロゲン様活性のみについて検討した。キンギョ成魚を用いた短期曝露試験における FD の有用性は確認されたが、今後、孵化仔稚魚への適用や長期曝露試験における有用性を明らかにするとともに、栄養学的評価や飼料摂取による肝酵素活性変化等についても検討する必要がある。また、Pelissero ら[25]は、市販の魚類用飼料中に女性ホルモンである E2 及びエストロン（E1）がそれぞれ 9.35±3.5 ng/g 及び 6.15±1.9 ng/g 含まれており、シベリアチョウザメ *Acipenser baeri* の血中ビテロゲニン合成に関与し、魚粉など生物由来の原料に E2 及び E1 が含まれている可能性を示唆した。今回、飼料中に含まれる E2 や E1 など天然由来の女性ホルモンについて評価を行っていないが、原材料として使用されている植物中には農薬やエストロゲン・アンタゴニスト作用を示す物質なども含まれる可能性が考えられる。本研究において、飼料中に含まれる植物エストロゲンが血中ビテロゲニン産生の主要因であることを示唆したが、それら以外の物質も魚類に影響を及ぼすことを考慮しなければならない。今後、酵母 two-hybrid 法やエストロゲン受容体結合試験など *in vitro* 試験系において、飼料中のエストロゲン・アゴニスト及びアンタゴニスト活性を調べるとともに、機器分析による化学物質の測定を併用し多角的な評価を行う必要がある。

本研究において、市販の魚類用飼料 TD 及び CD と大豆及び魚粉を含まない

カゼインを主原料とした試作飼料 FD 中の植物エストロゲン含量及び雄キンギョ血中ビテロゲニン産生について比較、検討した。CD は非常に高い植物エストロゲン含量を示し、雄キンギョの血中ビテロゲニンを産生することが示唆された。一方、試作飼料 FD は植物エストロゲン含量が低く、雄キンギョの血中ビテロゲニン産生を引き起こさなかったことから、試験化学物質のエストロゲン様作用を高感度に検出できる可能性が示唆された。これらの結果は、硬骨魚類の血中ビテロゲニン産生を指標とした内分泌かく乱化学物質のエストロゲン活性試験における重要な基礎資料となり、植物エストロゲン低含有飼料 FD 及びキンギョを用いた血中ビテロゲニン産生試験は、内分泌かく乱化学物質のエストロゲン活性評価に非常に有用であると考えられる。

3．5　参考文献

36) T. Colborn, F.S. vom Saal, A.M. Soto: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.,* Vol. 101, 378-384 (1993).

37) T. Colborn, D. Dumanoshi, J.P. Myers: Our Stolen Future. Dutton, NY, USA (1996).

38) F.R. Knudsen, A.E. Schou, M.L. Wiborg, E. Mona, K. Tollefsen, J. Stenersen, J.P. Sumpter: Increase of plasma vitellogenin concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to effluents from oil refinery treatment works and municipal sewage. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.,* Vol. 59: 802-806 (1997).

39) K.R. Munkittrick, M.E. McMaster, L.H. McCarthy, M.R. Servos, G.J. Van Der Kraak: An overview of recent studies on the potential of pulp-mill effluents to alter reproductive parameters in fish. *J. Toxicol. Environ. Health. B Crit. Rev.*, Vol. 1, 347-371 (1998).

40) N.R. Adams, M.R. Sanders: Persistent infertility in ewes after prolonged exposure to oestradiol-17β. *J. Reprod. Fertil.* Vol. 84, 373-378 (1988).

41) J.M. Obst, R.F. Seamark: Plasma hormone levels during pregnancy and parturition in ewes grazing Yarloop clover patures. *J. Reprod. Fertil.*, Vol. 29, 146-147 (1972).

42) D.A. Shutt, R.I. Cox: Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors *in vitro*. *J. Endocrinol.*, Vol. 52, 299-310 (1972).

43) M.A. Thompson, B.L. Lasley, B.A. Rideout, L.H. Kasman: Characterization of the estrogenic properties of a nonsteroidal estrogen, equol, extracted from urine of pregnant macaques. *Biol. Reprod.*, Vol. 31, 705-713 (1984).

44) H. Adlercreutz, K. Hockerstedt, C. Bannwart, S. Bloigu, E. Hamalainen, T. Fotsis, A. Ollus: Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *J. Steroid Biochem.*, Vol. 27, 1135-1144 (1987).

45) J.P. Sumpter, S. Jobling: Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 103, 173-178 (1995).

46) H. Ishibashi, K. Tachibana, M. Tsuchimoto, K. Soyano, Y. Ishibashi, M. Nagae, S. Kohra, Y. Takao, N. Tominaga, K. Arizono: *In vivo* testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Health Sci.*, Vol. 47, 213-218 (2001).

47) M. Kobayashi, N.E. Stacey: Effects of ovariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zool. Sci.*, Vol. 7, 715-721 (1990).

48) S. Yamanaka, K. Arizono, Y. Matsuda, K. Soyano, H. Urushitani, T. Iguchi, R. Sakakibara: Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 62, 1196-1200 (1998).

49) M.M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, Vol. 72, 248-254 (1976).

50) M. Axelson, J. Sjovall, B.E. Gustafsson, K.D. Setchell: Soya a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J. Endocrinol.*, Vol. 102, 49-56 (1984).

51) C. Pelissero, J.P. Sumpter: Steroid and "steroid-like" substances in fish diets. Aquaculture, Vol. 107, 283-301 (1992).

52) T. Nishihara, J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori, H. Utsumi: Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.*, Vol. 46, 282-298 (2000).

53) K. Morito, T. Hirose, J. Kinjo, T. Hirakawa, M. Okawa, T. Nohara, S. Ogawa, S. Inoue, M. Muramatsu, Y. Masamune: Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 24, 351-356 (2001).

54) C. Pelissero, B. Bennetau, P. Babin, F. Le Menn, J. Dunogues: The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 38, 293-299 (1991).

55) P.A. Copeland, P. Thomas: The measurement of plasma vitellogenin levels in a marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) by homologous radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, Vol. 91, 17-23 (1988).

56) A.E. Goodwin, J.M. Grizzle, J.T. Bradley, B.H. Estridge: Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, Vol. 101, 441-446 (1992).

57) 石橋弘志: バイオマーカー（ビテロジェニン）を用いた魚類生育環境評価法に関する研究. 長崎大学水産学部修士論文 (1999).

58) K.L. Thorpe, T.H. Hutchinson, M.J. Hetheridge, J.P. Sumpter, C.R. Tyler: Development of an *in vivo* screening assay for estrogenic chemicals using juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 19, 2812-2820 (2000).

59) D.L. DeKoven, J.M. Nunez, S.M. Lester, D.E. Conklin, G.D. Marty, L.M. Parker, D.E. Hinton: A purified diet for medaka (*Oryzias latipes*): refining a fish model for toxicological research. *Lab. Anim. Sci.*, Vol. 42, 180-189 (1992).

60) C. Pelissero, B. Cuisset, F. LeMenn: The influence of sex steroids in commercial meals and fish diets on plasma concentration of estrogens and vitellogenin in cultured Siberian sturgeon *Acipense baeri*. *Aquat. Living Resour.*, Vol. 2, 161-168 (1989).